

OK-432経口投与によって誘導される末梢血および 胸管リンパ球の細胞障害性の検討

—宿主要因からみた相違—

藤田学園保健衛生大学第2病院外科

松本 純夫 丹 光明 永井 研治 杉本 辰雄
杵名 哲治 塚田 規夫 吉崎 聰

THE EFFECTS OF ORAL ADMINISTRATION OF OK-432 ON THE CYTOTOXICITIES OF PERIPHERAL AND THORACIC DUCT LYMPHOCYTES IN RESPECT OF HOST FACTORS

Sumio MATSUMOTO, Mitsuaki TANN, Kenji NAGAI,
Tatsuo SUGIMOTO, Tetsuji KITSUNA, Norio TSUKADA
and Satoshi YOSHIZAKI

Department of Surgery, Second Teaching Hospital, School of Medicine,
Fujita-Gakuen Health University

消化器癌を中心とした再発担癌症例10例にOK-432経口投与を施行し、末梢血リンパ球のナチュラルキラー(NK)活性の変動と宿主要因の相関について検討した。肺およびリンパ節転移例では5例中4例(80%)に、転移の証明されなかった2例では2例(100%)にNK活性の上昇を投与後認めた。肝転移例では転移巣の大きさにより変動の程度が異なり、亜区域大の転移巣を有する症例はNK活性の上昇を認め、3区域大の症例ではNK活性の低下を認めた。1区域大の症例ではNK活性の変動を認めなかった。以上、OK-432経口投与では肝臓、特にKupffer細胞を中心とした細網内皮系の機能が正常に保たれていることが重要と思われた。

索引用語：免疫調節剤、消化管付属リンパ組織、胸管リンパ球

緒 言

近年、消化器癌手術後の補助療法として種々の化学療法剤に加えて免疫調節剤が使われるようになった。Biological response modifier (BRM)の一つである溶連菌製剤OK-432は腫瘍内投与¹⁾、筋肉投与²⁾、皮内投与³⁾によって延命効果があることが報告されてきた。その免疫賦活効果はインターロイキン1 (interleukin 1: IL-1)、インターロイキン2 (interleukin 2: IL-2)⁴⁾、インターフェロン(interferon: IF)⁵⁾の産生増加、それに伴うマクロファージ⁶⁾、好中球⁷⁾、ナチュラルキラー(natural killer: NK)⁸⁾、lymphokine activated killer

(LAK)⁹⁾の活性化によるとされてきた。OK-432の免疫賦活効果が明確になるにつれ、投与方法も腫瘍内、筋肉内投与から著しい発熱などの副作用の発現頻度が少なく、感作状態の亢進作用の面で優れた皮内投与が主として行われるようになった³⁾。

一方、腸管局所免疫機構が明らかになるにつれ¹⁰⁾、消化管内でも感作が成立すると考えられるようになり、経口投与が試みられるようになった¹¹⁾¹²⁾。われわれは再発癌症例を中心にOK-432の経口投与を試みたところ、再発癌の占拠部位に応じて免疫賦活効果、特にNK活性化の反応が異なることを見いだしたので、興味ある事実と思い、報告する。

対象および方法

対象は主として消化器癌を中心とした再発固形癌の

<1988年11月2日受付>別刷請求先：松本 純夫
〒454 名古屋市中川区尾頭橋3-6-10 藤田学園
保健衛生大学第2病院外科

表 1 対象症例一覧

番号	診断	手術	担癌	転移部位
1.	肺癌	尿管空腸吻合	+	リンパ節
2.	直腸癌	低位前方切除術	+	肺
3.	胃癌	胃全摘	-	-
4.	胃癌	胃全摘	-	-
5.	上行結腸癌	右半結腸切除術	+	肝
6.	肺癌	左下葉切除術	+	肺
7.	直腸癌	マイルス手術	+	肝
8.	乳癌	定型的乳房切断術	+	肺
9.	胆嚢癌	胆嚢摘除術	+	リンパ節
10.	肺癌	——	+	肝

10例で、再発診断のためにウィルヒョウリンパ節生検を施行するとともに胸管リンパ液中の細胞診を行った(表 1)。

投与方法：OK-432は 1 回20KE を隔日 3 回経口投与した。

細胞障害性試験：投与前および最終投与翌日に末梢血リンパ球(peripheral blood lymphocyte: PBL)、胸管リンパ球(thoracic duct lymphocyte: TDL)を比重遠沈法¹³⁾にて採取した。5%牛胎児血清(Flow社製)加 RPMI1640(GIBCO社製)に PBL は 4×10^6 /ml, TDL は 10^7 /ml の濃度で浮遊させ、その細胞障害性を 4 時間⁵¹Cr 放出試験により測定、細胞障害性%=(実験群 cpm-対照群 cpm)×100/(最大解離 cpm-対照群 cpm) の式で細胞障害性を求め比較検討した。測定は triplicate で行い、effector/target(E/T)比は PBL で当初20, 10, 5, TDL で100, 50, 25として 5 例測定したが、常に E/T 比の増大に応じて一定の細胞障害性上昇の傾きが得られたため、残りの 5 例は E/T 比を PBL では20, TDL では100として測定した。そのため今回はすべての測定結果のそろった E/T 比で報告する。推計学的検討には t-検定を用い、P<0.05を有意の差とした。標的細胞として natural killer (NK) 感受性の赤白血病細胞株由来 K562, NK 非感受性で lymphokine activated killer (LAK) 活性の指標とされるパーキットリンパ腫細胞株由来の Daudi を用いた。

リンパ球亜群解析：リンパ球亜群をフローサイトメトリー法で測定した。解析には Ortho 社および Becton Dickinson 社製のモノクローナル抗体を使用した。

動物実験：生後 8~12週、体重約200g のウィスター雄性ラットを用い、OK-432を5KE/匹経口投与し、経時的にネブプタール麻酔下に開腹、門脈より2.5%、Glutaraldehyde を注入、肝を環流したのちに摘出、同時に空腸、脾臓も摘出、固定したのち電子顕微鏡にて

表 2 OK-432経口投与前後における末梢血および胸管リンパ球の細胞障害性の変動

標的細胞 OK-432 経口 投与前 症例	末梢血リンパ球				胸管リンパ球			
	K562		Daudi		K562		Daudi	
	前	後	前	後	前	後	前	後
1	33.8	30.9	-	-	2.7	11.2	0.4	0.1
2	63.8	67.4	4.9	0.2	39.2	15.8	12.2	5.6
3	44.3	61.8	-	-	6.1	5.6	-	-
4	29.8	42.7	-	-	1.2	16.2	-	-
5	47.4	55.4	7.4	12.0	10.5	11.4	3.5	3.7
6	11.8	50.9	2.3	1.6	2.5	13.2	2.5	0.0
7	75.8	22.7	1.3	3.3	14.5	5.3	1.2	4.0
8	31.5	50.1	7.1	9.5	1.2	12.2	2.5	9.5
9	53.8	69.3	6.9	17.3	15.6	7.8	4.9	6.6
10	66.6	65.3	5.0	15.7	27.0	10.2	10.2	14.5
平均±SD	45.9±19.7	51.7±15.7	5.0±2.4	8.5±6.9	12.1±12.6	10.9±3.8	4.7±4.3	5.5±4.8

観察した。対照は生理食塩水投与とした。

結果

OK-432経口投与前後の PBL および TDL の細胞障害性の変動：表 2 に全例の OK-432経口投与前後での細胞障害性の測定結果を示した。全例を平均して比較すると PBL の K562を標的とした場合は投与前 45.9 ± 19.7 、投与後 51.7 ± 15.7 で軽度上昇を認めたが有意差はなかった。Daudi を標的とした場合は投与前 5.0 ± 2.4 、投与後 8.5 ± 6.9 でこれも有意差を認めなかった。TDL の K562を標的とした場合は投与前後で、それぞれ 12.1 ± 12.6 、 10.9 ± 3.8 と軽度低下、Daudi を標的とした場合はそれぞれ 4.7 ± 4.3 、 5.5 ± 4.8 と軽度上昇したが有意の差は認めなかった。

再発部位別にみた PBL の細胞障害性の変動：再発部位別に K562, Daudi を標的細胞として PBL の細胞障害性をみた結果を図 1 に示した。各カラムの右側の小文字の数字は症例番号を示している。K562を標的細胞とした場合を見てみると肝転移では症例 5 は細胞障害性が増しているが、症例 10 では不変、症例 7 では顕著な下降を示した。肺転移、リンパ節転移の 5 例では症例 1 を除きすべて細胞障害性の上昇を認めた。転移部位の証明されなかった 2 例ではいずれも上昇した。Daudi の場合は肝転移を有した 3 例はいずれも細胞障害性の上昇を認めた。肺転移の 3 例は反対に低下を認めた。リンパ節転移の症例 9 は細胞障害性の上昇を認めた。

再発部位別にみた TDL の細胞障害性の変動：肝転移例では K562を標的細胞とした場合、不変かあるいは細胞障害性の低下を示し、PBL とは明らかに反応が異なった。TDL は症例 5 を除き 3 例中 2 例が上昇を示

図1 再発部位別にみたPBLの細胞障害性の変動。細胞障害性は⁵¹Cr放出試験により%で示した。細胞障害性%=(実験群 cpm-対照群 cpm)×100/(最大解離 cpm-対照群 cpm)

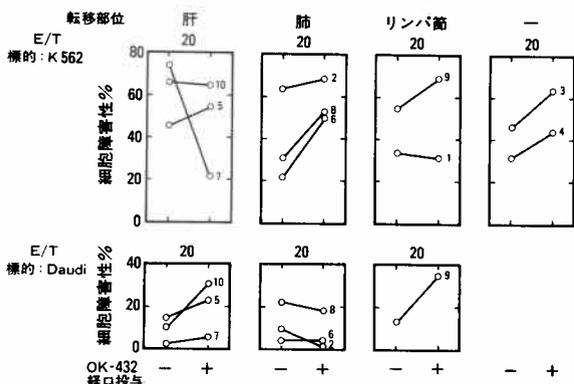
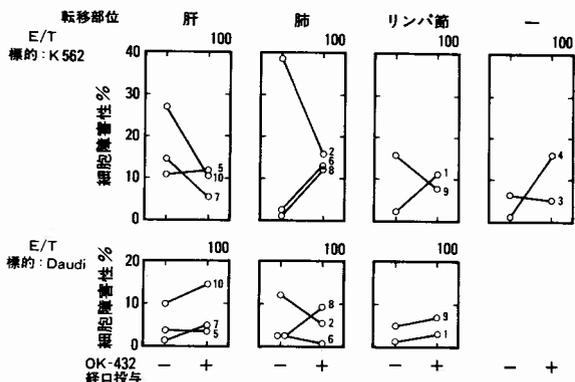


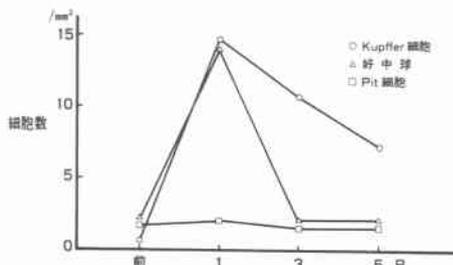
図2 再発部位別にみたTDLの細胞障害性の変動。細胞障害は⁵¹Cr放出試験により%で示した。



した。肺転移例でな投与前に高い細胞障害を示した症例2がK562, Daudiに対しても殺細胞性の低下を示し、PBLとは反応が異なった。その他の症例6と8でもDaudiを標的とした場合PBLとの殺細胞性の上で相関は無かった。リンパ節転移例でもK562を標的とした場合、PBLと逆の殺細胞性の変動をTDLは示した(図2)。

動物実験の結果: Kupffer細胞は投与後1日別に投与前の4~5倍に増加し、3日目に暫減し5日目には投与前の約2倍にまで減少した。Pit細胞は投与後1日目に増加するように見えたが明らかな変動は認めなかった。内皮細胞、伊東細胞に明らかな変動は認めなかった。投与後1日目に脾臓で好中球数が増加したが、3日目以後は投与前値に復した(図3)。

図3 OK-432経口投与後の肝Kupffer細胞, Pit細胞および脾好中球数の経時的変動。Kupffer細胞および好中球は投与後1日目に増加し、5日目には投与前値に復した。Pit細胞はほとんど変動が認められなかった。



考 察

今回われわれが検討しなかったのは再発担癌患者に対して従来皮内、筋肉内あるいは腫瘍内投与されてきたOK-432が経口投与でどの程度免疫応答を宿主に誘導するかにあった。PBLのK562に対する殺細胞性をナチュラルキラー(NK)の活性とみなした場合、検討した10例の平均でみるとNK活性は軽度上昇したが有意の差は得られなかった。しかし転移部位別にみると、肺転移、リンパ節転移例は5例中4例(80%)にNK活性の上昇が投与後認められた。肝転移を有する症例ではNK活性の上昇するもの、不変のもの、低下するものと反応が分かれた。図4, 5, 6はそれぞれ症例5, 10, 7のcomputed tomography(CT)像である。転移巣の大きさを比較すると症例5は亜区域大、症例7は右葉全体3区域を占める大きなもので、症例10は複数の転移巣を集めて1区域を越える程度であり、症例5と7の中間程度の大きさであった。NK活性でみると転移の小さかった症例5はNK活性上昇を示し、転移の巨大であった症例7はNK活性の著しい低下を示し、中間の症例10はNK活性ほとんど不変であった。OK-432は菌体成分であり経口投与された場合、ある程度は吸収されること、そして消化管上皮下のマクロファージに貪食されることを著者はすでに報告している¹²⁾。動物実験では腹腔内投与されたOK-432はタクロファージに貪食され、これを刺激し、IL-1, 2, IFなどを放出し、NK活性化、キラー活性を持つ細胞の誘導につながるとされている^{4)~6)}。経口投与され吸収されたOK-432がリンパ管系に流入するか門脈系に流入するかは興味のあるところで、著者はリンパ管系の関与を胸管リンパへOK-432が流入する事実から報告したことがある¹⁴⁾。その後症例の検討でOK-432

図4 症例5, 上行結腸癌肝転移例のCT像.
 亜区域大の転移巣.

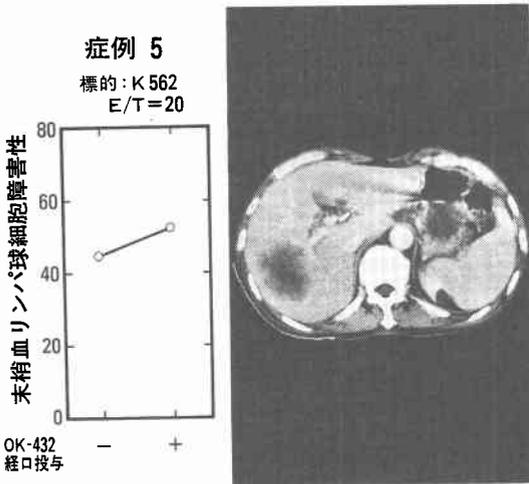


図6 症例7, 直腸癌の肝転移例のCT像.
 3区域大の転移巣を有する.

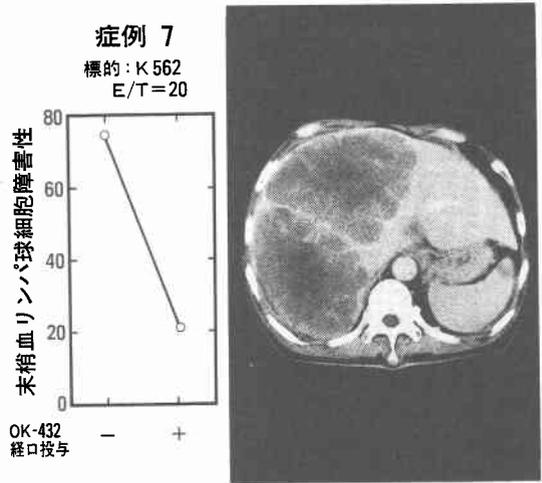
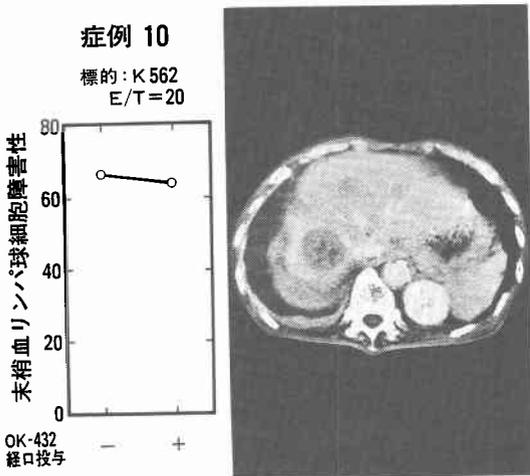


図5 症例10, 肺癌の肝転移例のCT像. 2, 3, 4, 5, 6区域の小転移巣を加えると1区域大の転移巣となる.



運ばれ, Kuffer 細胞数の増加となって現れる経路があることが考えられる. しかし現在までの検討ではラットの肝臓におけるNK細胞とされるPit細胞はOK-432経口投与によってもほとんど変動せず, Kupffer細胞の増加とPBLの活性上昇との関連が解明できず現在検討中である. 臨床例の肝転移の場合は, 亜区域大の転移までは細網内皮系の細胞数もかなり残り, その機能も正常に保たれ, 解明されていない経路を通じてNK活性の上昇として生体は反応したが, 3区域にも転移巣が大きくなると細網内皮系細胞数の相対的低下状態に陥り, NK活性の低下として反応したものと考えている.

Duadiを標的とした細胞障害性をLAK活性とみなすと, NK活性が低下する場合でもLAK活性は逆に上昇することもあり, 生体では細胞障害性については精妙な平衡関係が働いていることを類推させる. TDLのNK, LAK活性は必ずしもPBLのそれと一致せず, これも今後の検討課題である.

また, 生体においてNK活性の上昇が担癌個体の生命延長につながるか否かはヒトの場合いまだ不明であり, 今後も検討が必要であると考えている.

結 語

消化器癌再発症例を中心にOK-432経口投与を試み下記の結論を得た.

1. 再発部位が肺, リンパ節の症例では経口投与後, PBLのNK活性の上昇を認めた.
2. 再発部位が肝臓の症例では転移巣の小さいもの

経口投与前後でTDLをOK-432 0.1KE/mlの存在下で24時間培養すると, IFが554U/mlから1,623U/mlと上清中に増加することが判明した(未発表データ). このTDLのIF産性能の上昇がNK活性増強に影響をおよぼしている可能性はあると考えている. 一方, ラットでOK-432を経口投与すると肝臓でKupffer細胞数が一過性に増加することからOK-432経口投与後の一連の反応には消化管上皮のマクロファージのあとにおそらく門脈を介して細胞性あるいは液性に情報が

ではPBLのNK活性の上昇を、3区域を越えるような大きな転移巣の症例ではNK活性の低下を認めた。

3. ラットではOK-432経口投与によって、Kupffer細胞数の増加が認められたが、NK, LAK活性上昇との関連は明らかではなく、今後の検討が必要であると考えられた。

本論文の要旨は第29, 30回日本消化器外科学会総会, 第87回日本外科学会総会にて報告した。また本研究のLAK活性に関わる部分の一部は文部省科学研究費によった。

文 献

- 1) 豊田文一：溶連菌製剤PC-B-45の頭頸部悪性腫瘍に及ぼす影響。日耳鼻会報 72：1332—1338, 1969
- 2) 東海胃癌免疫化学療法共同研究班：進行胃癌の術後免疫化学療法に関する研究。癌と化療 3：715—721, 1976
- 3) 花上 仁, 野本信之助, 吉崎 聡ほか：非切除, 再発癌に対する溶連菌製剤OK-432の免疫療法—皮下内投与と筋肉内投与法における免疫学的パラメータの推移と生存期間の検討。日癌治療会誌 17：1975—1985, 1982
- 4) Ichimura O, Suzuki S, Saito M et al：Augmentation of interleukin 1 and interleukin 2 production by OK-432. Int J Immunopharmacol 7：263—270, 1985
- 5) 斉藤元男, 山口高弘, 青沼悦子ほか：OK-432の抗腫瘍効果(1)—OK-432誘起インターフェロン- γ (INF γ)の抗腫瘍効果—。癌と化療 9：2031—2037, 1982
- 6) 斉藤元男, 青沼悦子, 野田哲生ほか：OK-432の抗腫瘍効果(2)—OK-432誘起活性化M ϕ の抗腫瘍性—。癌と化療 10：1363—1371, 1983
- 7) Katano M, Torisu M：New approach to management of malignant ascites with a streptococcal preparation, OK-432. II. Intraperitoneal inflammatory cell-mediated tumor cell destruction. Surgery 93：365—373, 1983
- 8) 若杉 尋：溶連菌製剤OK-432のNatural killer細胞活性増強作用に関する基礎的研究。日外会誌 83：38—52, 1982
- 9) Saito M, Ichimura M, Kataoka M et al：Pronounced antitumor effect of LAK-like cells induced in the peritoneal cavity of mice after intraperitoneal injection of OK-432, a killed streptococcal preparation. Cancer Immunol Immunother 22：161—168, 1986
- 10) Rothberg RM, Kraft SC, Michalek SM：Systemic immunity after local antigenic stimulation of the lymphoid tissue of the gastrointestinal tract. J Immunol 111：1906—1913, 1973
- 11) 仁尾義則, 大垣和久, 稲本 俊ほか：ピンパニール(OK-432)経口投与の試み(第2報)。日癌治療会誌 19：71—79, 1984
- 12) 松本純夫, 永井研治, 杉本辰雄ほか：OK-432経口投与によって誘導される胸管リンパ球の細胞障害性の解析。日消外会誌 19：2159—2159, 1986
- 13) 辻 公美：比重遠沈法によるリンパ球の分離。右田俊介編。免疫実験操作法A。日本免疫学会, 金沢, 1976, p443—446
- 14) Matsumoto S, Nagai K, Sugimoto T et al：Cytotoxicity induced in thoracic duct lymphocytes by oral administration of a streptococcal preparation, OK-432. Edited by Tobe T. New Applications of OK-432. Excerpta Medica Tokyo, 1986, p39—46